บทที่ 1

บทนำ

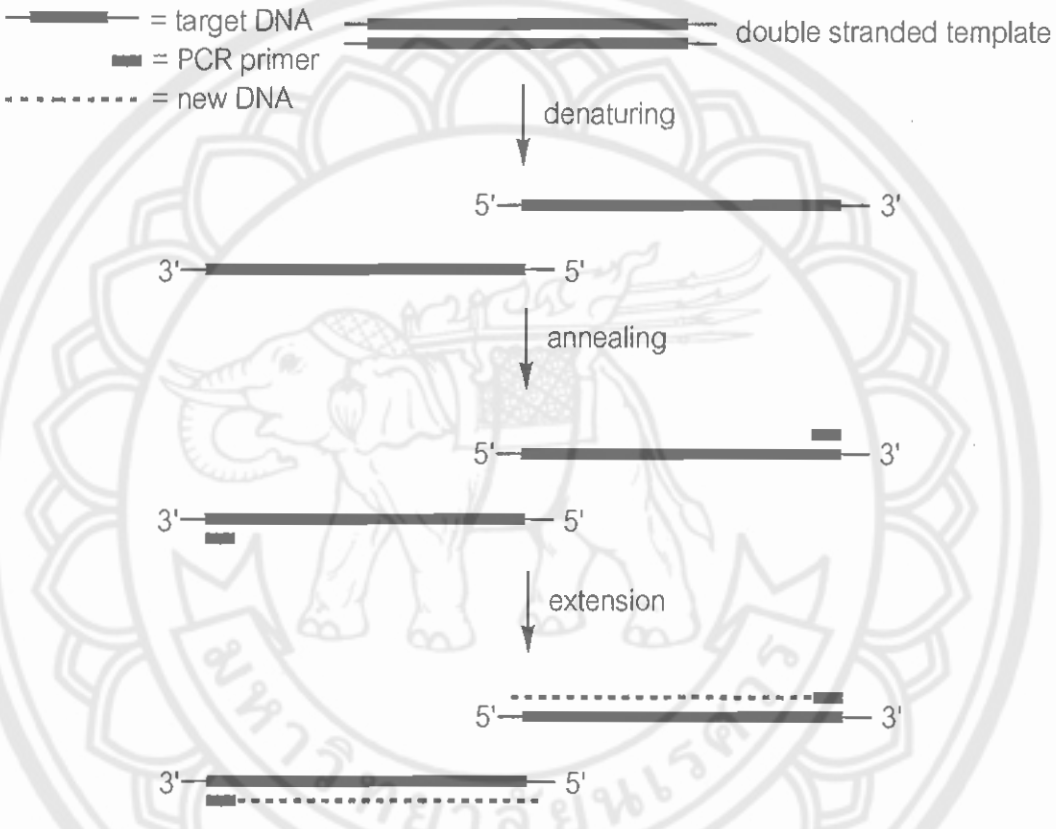
ความเป็นมาของปัญหา

ปฏิกิริยาโพลีเมเรสเชน (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR) [1], [2] เป็นเทคนิคสำหรับการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการถ่ายแบบของดีเอ็นเอ (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภาย ในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นหลายล้านโมเลกุล เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากทางด้านการแพทย์ เช่น การตรวจวิเคราะห์โรคทางพันธุกรรม การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค (เช่น โรคเอดส์, วัณโรค, มาเลเรีย) การตรวจหายีนก่อมะเร็ง (เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่) ซึ่งประโยชน์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น [3], [4], [5], [6]

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคนี้จะใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และมีดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) 2 ชนิด เป็นโอลิโกนิวคลิโอไทด์ขนาดสั้นๆ ยาวประมาณ 20 เบส โดยที่ดีเอ็นเอไพรเมอร์นี้จะต้องมีลำดับเบสที่เป็นคู่สม (Complementary) กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่งส่วนหัวและส่วนท้าย แสดงในภาพ 1 ซึ่งเป็นการกำหนดความยาวของการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นให้อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษา ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ชนิดต่าง ๆ ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น

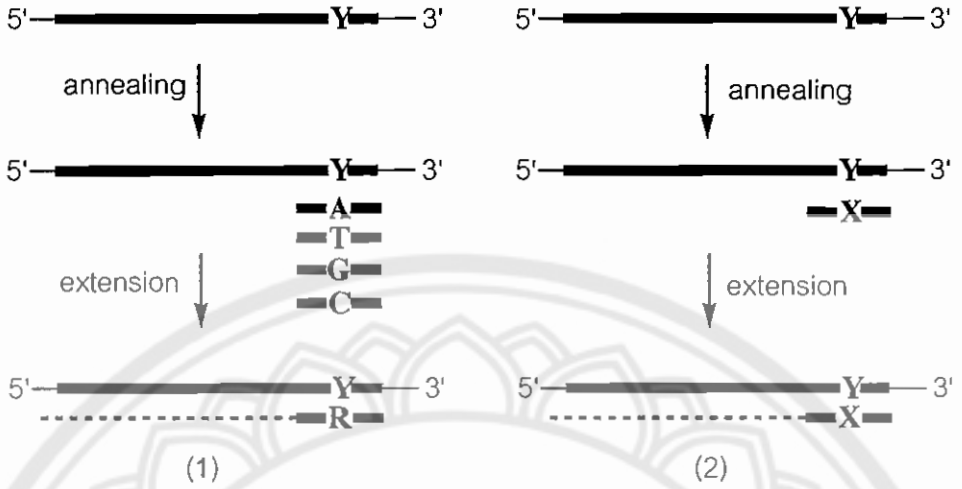
ขั้นตอนของเทคนิค PCR ดังกล่าวจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งส่วนหัวและท้ายของดีเอ็นเอต้นแบบที่แน่นอน [1] แต่อย่างไรก็ตามในการทำการหาลำดับของเบส (DNA sequence) มักจะพบตำแหน่งที่ไม่สามารถบอกได้ว่าที่ตำแหน่งนั้นเป็นเบสชนิดใด (Ambiguous position) ซึ่งเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เช่น การเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใน species เดียวกัน เช่น single nucleotide polymorphisms หรือ การเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใน species ที่ใกล้เคียงกัน วิธีการแก้ปัญหาเบสที่เป็น ambiguous base ตำแหน่งดังกล่าวทำได้โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนเบสอะดีนีน (Adenine, A) ไทมีน (Thymine, T) ไซโทซีน (Cytosine, C) และ กัวนีน (Guanine, G) เพื่อใช้เป็นเบสคู่สมกับตำแหน่งที่เป็น ambiguous base ทำให้การสังเคราะห์นี้ต้องใช้ไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์

ต่อ ambiguous base หนึ่งตำแหน่ง แต่จะมีแค่ 1 ไพรเมอร์เท่านั้นที่เป็นเบสคู่สมที่เกิดปฏิกิริยาและสามารถเกิดสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ได้ แสดงในภาพ 2 ซึ่งการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะใช้เวลาในการสังเคราะห์ที่มากขึ้น และเสียค่าใช้จ่ายที่สูงทั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์และการแยกให้บริสุทธิ์



ภาพ 1 กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ด้วยสาเหตุดังกล่าวข้างต้น การใช้ยูนิเวอร์ซอลเบสซึ่งเป็น nucleobase analogues [7] ที่แสดงคุณสมบัติไม่เฉพาะเจาะจงในการเข้าคู่กับไนโตรเจนเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด จึงมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในการนำไปใช้เป็นไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเบสชนิดใด การนำยูนิเวอร์ซอลเบสมาเป็นเบสคู่สมกับเบสตำแหน่งที่เป็น ambiguous base แสดงในภาพ 2 ทำให้การสังเคราะห์ทำได้สะดวก รวดเร็ว และลดค่าใช้จ่ายลงอย่างมากในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคนี้

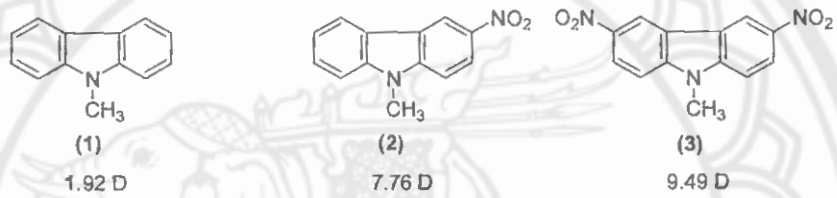


ภาพ 2 เปรียบเทียบกระบวนการสังเคราะห์ด้วย PCR เมื่อพบ ambiguous base (Y)
(1) ใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยเบส A, T, C และ G (R = A, T, C หรือ G)
(2) ใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยยูนิเวอร์ซอลเบส (X)

แต่จากการศึกษาและทดลองจากอดีตจนถึงปัจจุบันยังไม่มี ยูนิเวอร์ซอลเบสตัวใดที่มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับคุณสมบัติที่ดีในอุดมคติ ดังนั้นการพัฒนายูนิเวอร์ซอลเบสแบบใหม่โดยอาศัยการปรับปรุงโครงสร้างของเบส ด้วยหลักการเกิด stacking interaction ภายในโครงสร้าง DNA มาพัฒนายูนิเวอร์ซอลเบสให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น [8] และมีความเสถียรมากขึ้นจึงมีความสำคัญอย่างมากถึงแม้ว่าโครงสร้างนั้นจะเป็น non-complementary base ก็ตาม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงให้ความสนใจในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่มของคาร์บาโซลซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่รูปร่างขนาดใหญ่และมีค่าไดโพลโมเมนต์สูง จากการคำนวณค่าไดโพลโมเมนต์ของสารอนุพันธ์ของคาร์บาโซล โดยใช้หมู่ของเมทิล ($-CH_3$) แทนที่ส่วนที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างของ PNA backbone ด้วยโปรแกรม Gaussian 03 พบว่า 9-methylcarbazole (1), 9-methyl-3-nitrocarbazole (2) และ 9-methyl-3,6-dinitrocarbazole (3) มีค่าไดโพลโมเมนต์เท่ากับ 1.92 D, 7.76 D และ 9.49 D ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 3 จากค่าไดโพลโมเมนต์ของอนุพันธ์คาร์บาโซลน่าจะก่อให้เกิดการ stacking ของส่วนของหมู่อะโรมาติก (Aromatic moiety) ได้ดี โดยในการศึกษานี้จะทำการสังเคราะห์และวิเคราะห์ยูนิเวอร์ซอลเบสในสารประกอบ PNA (Peptide Nucleic Acid) ซึ่งเป็นสารที่ออกแบบและสังเคราะห์เลียนแบบดีเอ็นเอ โดย PNA ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีกว่าดีเอ็นเอหลายประการ [9] เช่น ความง่ายในการสังเคราะห์ เนื่องจากในโครงสร้างหลักของ PNA เป็นโมเลกุลที่เป็นโมเลกุลอะไครัล (Achiral) และค่า melting temperature (T_m) ที่

สูงของโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ PNA:DNA ทำให้ง่ายต่อการสังเกตค่าความแตกต่างในการเข้าคู่กับไนโตรเจนเบส (ΔT_m) และผลของการศึกษาโดยวิธีดังกล่าวจะทำให้ได้โครงสร้างของเบสที่มีคุณสมบัติเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดี เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติในการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสสำหรับดีเอ็นเอต่อไป และสามารถนำข้อมูลจากการศึกษายูนิเวอร์ซอลเบสในกลุ่มของอนุพันธ์ของคาร์บาโซลที่มีคุณสมบัติที่ดีหรือใกล้เคียงกับค่าในอุดมคติมาใช้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่ทราบลำดับของเบสที่แน่นอนซึ่งส่งผลต่อกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่สะดวกและรวดเร็ว และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ ทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



ภาพ 3 ค่าไดโพลโมเมนต์ของสารอนุพันธ์คาร์บาโซล

จุดมุ่งหมายของโครงการวิจัย

พัฒนาและสังเคราะห์ยูนิเวอร์ซอลเบสแคนดิแดท (Universal base candidate) และศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบส เช่น melting temperature (T_m) และ ค่าพลังงานอิสระ (ΔG) เป็นต้น

ความสำคัญของการวิจัย

1. สามารถทราบถึงวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบกลุ่มคาร์บาโซล และกลุ่มของ PNA

2. สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบกลุ่มคาร์บาโซล และกลุ่มของ PNA โดยมีเปอร์เซ็นต์ของสารผลิตภัณฑ์ที่สูง

3. สามารถศึกษาหาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดี ของอนุพันธ์สารประกอบกลุ่มคาร์บาโซล นำไปใช้เป็นไพรเมอร์ ในเทคนิค PCR มีประโยชน์มากทางด้านการแพทย์ สามารถช่วยทำให้ประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรคดำเนินการได้อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง

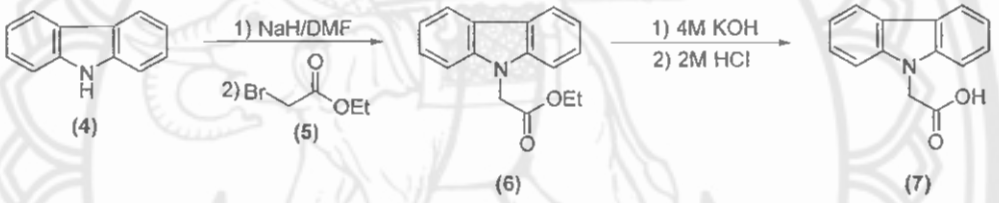
ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบกลุ่มคาร์บาโซล และกลุ่มของ Peptide Nucleic Acid (PNA) ได้

2. ทำการศึกษาหาค่า $\Delta G/\Delta T_m$ ของ PNA โอลิโกเมอร์ (PNA oligomer) ของอนุพันธ์กลุ่มคาร์บาโซลได้

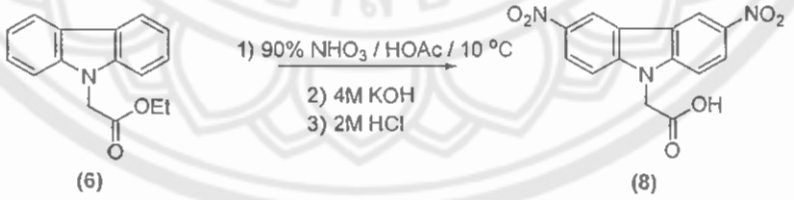
สรุปแนวทางการสังเคราะห์

1. การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid (7)



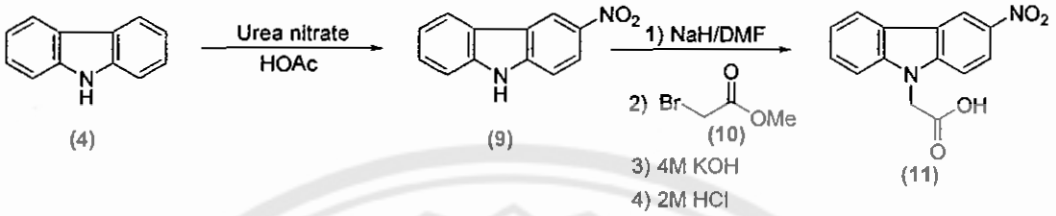
ภาพ 4 การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid (7)

2. การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)



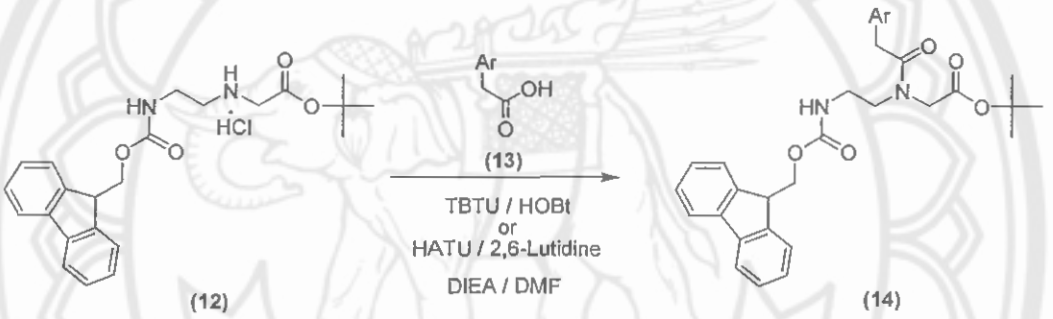
ภาพ 5 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

3. การสังเคราะห์ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11)



ภาพ 6 การสังเคราะห์ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11)

4. การสังเคราะห์ PNA โมโนเมอร์



ภาพ 7 การสังเคราะห์ PNA โมโนเมอร์